

**Überlebenszeit von Knochenmarkszellen
nach dem Tode,
gemessen mit einer in vitro-Methode**

Marie Luise Bannert

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hämatologie
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München
Leiter: Priv.-Doz. Dr. S. Thierfelder

Überlebenszeit von Knochenmarkszellen
nach dem Tode,
gemessen mit einer in vitro-Methode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marie Luise Bannert

aus
Bad Tölz

1973



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. S. Thierfelder

Mitberichterstatter: Prof. R. Marx

Dekan: Prof. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9.10.1973

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

Material und Methoden

1. Versuche mit Mäuse-Knochenmarkszellen
2. Versuche mit menschlichen Knochenmarkszellen
3. Kulturmedium
4. Kulturtechnik
5. Auswertung
6. Schwierigkeiten
7. Versuchsplan
8. Trypanblaumethode

Ergebnisse

1. mit Mäuse-Knochenmark
2. mit menschlichem Knochenmark

Diskussion

Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Einleitung

In der Klinik wird man heute in zunehmendem Maß mit dem Problem der Organtransplantation konfrontiert. Während bei unpaaren Organen wie Herz, Leber, aber auch Lunge, von vornherein nur eine Leichenorgan-Transplantation in Frage kommt, gibt es bei gewissen Organen wie Niere, Blut, Knochenmark grundsätzlich auch die Möglichkeit der Lebendspende. Aber auch hier haben Leichenorgane gewisse Vorteile: Abgesehen von der Blutspende bedeutet die Entnahme eines Organs für den Spender ein mehr oder weniger großes Risiko. Außerdem steht im Bedarfsfall nicht immer ein Lebendspender zur Verfügung.

Gerade was das Knochenmark betrifft, so steigt infolge der Umweltveränderungen durch Abgase, Abfallstoffe und Industriegifte die Zahl der Patienten mit gestörter Blutbildung ständig. Da eine konservative Therapie hier nur in ca 1/3 der Fälle Erfolg hat, ergibt sich die Frage der Transplantation von Knochenmark.

Die immunologischen Probleme sind bisher auch für die Knochenmarkstransplantation noch nicht völlig gelöst, in einigen speziellen Fällen konnte eine Transplantation jedoch mit Erfolg durchgeführt werden: Bei Patienten mit Wiscott-Aldrich Syndrom (Bach et al.4), mit Leukämie (Santos et al.4,26; Thomas et al.4; Mathé et al.4,12) und mit lymphopenischer Hypogammaglobulinämie

(Gatti et al.4,19; de Koning et al.4).

Als Organspender kommen im gegenwärtigen Stadium in erster Linie gewebsverträgliche Geschwister des Patienten in Frage. Falls Geschwister fehlen oder eine Organspende aus anderen Gründen nicht möglich ist, versucht man HL-A identische Unverwandte als Spender zu gewinnen oder das Knochenmark von gewebsunverträglichen Spendern vor der Übertragung zum Zweck der besseren Verträglichkeit zu manipulieren.

Um Patienten helfen zu können, welche keine geeigneten Spender in ihrer eigenen Familie haben, richtete man 1959 in Frankreich eine Knochenmarksbank ein. Sie vermittelt Knochenmark von getesteten lebenden Spendern. In diesem Zusammenhang ergibt sich die Frage, ob nicht auch Knochenmark von Verstorbenen verwendet werden könnte. Das hätte den Vorteil, daß größere Mengen desselben Marks zur Verfügung stünden und das Risiko der Entnahme am Lebenden wegfiel.

Voraussetzung für die Durchführung von Leichenknochenmarkstransplantationen wäre jedoch

1. die Kenntnis, zu welcher Zeit nach dem Tod des Spenders das Knochenmark noch entnommen werden kann, ohne daß es seine Fähigkeit verloren hat, in den Markräumen des Empfängers wirksam zu werden und
2. eine geeignete Lagerungstechnik für das dem toten Spender entnommene Knochenmark.

Ziel der folgenden Arbeit ist es, mit Hilfe einer in vitro-Technik (Pluznik und Sachs 22, Bradley und Metcalf 2, Ichikawa 9) zu prüfen, wie lang nach dem Tod das Knochenmark noch aus dem Kadaver entnommen und mit Aussicht auf Erfolg übertragen werden kann. Experimentell soll diese Frage am Tiermodell (Maus) untersucht werden. Zusätzliche Daten von Versuchen mit menschlichem Knochenmark aus dem Sektionssaal sollen das Bild ergänzen.

Material und Methoden

1. Versuche mit Mäuse-Knochenmarkszellen

Es wurden 8 bis 10 Wochen alte C_3H -Mäuse, männliche und weibliche Tiere in zufälliger Reihenfolge, verwendet.

Herstellung der Knochenmark-Zellsuspension:

Für jeden Versuch wurden 3 Tiere in Äther getötet und bis zur Präparation im Kühlschrank bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt. Nach Hautdesinfektion mit 10%iger Sagrotanlösung wurde das Fell von den Unterschenkeln bis zur Brust aufgeschnitten und durch Nadeln vom Körper weggehalten. Mit einem sterilen Besteck wurden die beiden Femora steril entnommen, am proximalen und distalen Ende aufgeschnitten und mittels einer Kanüle und Spritze mit ca 5 ml Medium CMRL 1066 + 2% Penicillin/Streptomycin das Knochenmark herausgespült. Der Knochenmarkszylinder wurde in einer sterilen Petrischale aufgefangen und durch

wiederholtes sanftes Aufziehen und Auspressen mit einer Spritze ohne Kanüle wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt.

2. Versuche mit menschlichen Knochenmarkszellen

Es wurden Knochenmarkszellen von lebenden Patienten, von eben Verstorbenen und von Leichen aus dem Sektionsaal zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Tod durch Sternalpunktion oder Punktion des Beckenkammes entnommen.

Vor dem Ansaugen des Knochenmarks wurde die Innenwand der Spritze mit Heparin (Liquemin-Roche) befeuchtet. Nach der Entnahme wurde die Spritze verschlossen, der Inhalt durch sanftes Schütteln gemischt und in eine sterile Petrischale gegeben, die etwa die gleiche Menge Medium CMRL 1066 enthielt. Nach Mischen durch sanftes Aufziehen und Auspressen mittels einer sterilen Spritze ohne Kanüle wurde die Suspension auf ein Drahtsieb mit einem Porendurchmesser von 200 μ gebracht und durch vorsichtiges Tupfen und Kreisen mit einem sterilen Teflonstempel durch das Sieb gepreßt. Größere Knochenteilchen blieben dabei zurück. Aus der gesiebten Suspension wurde ein Tropfen zur Bestimmung der Zahl der kernhaltigen Zellen entnommen und die Knochenmarkszellen in geeigneter Konzentration in das Kulturmedium gebracht.

3. Kulturmedium

Die Knochenmarkszellen wurden in einem semisoliden Me-

dium folgender Zusammensetzung immobilisiert:

100 ml Medium enthielten:

- 50 ml Methylzellulose-Lösung (Dow Methocel Powder, Visc. 4000 cps.)
- 28 ml Medium CMRL 1066
- 10 ml fetales Kälberserum (FCS)
- 10 ml L-conditioned Medium
- 2 ml Rinder-Albuminlösung (BSA)
- 2 mg L-Asparagin (Serva, Heidelberg)
- 10 mg Streptomycin/Penicillin
- 2 Tropfen Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

Folgende Einzelschritte waren zur Herstellung des Kulturmediums notwendig:

Herstellung der Methylzellulose-Lösung:

8 g Methocel wurden abgewogen und unter UV-Licht gelegt (30 Min) dann 250 ml heißes, autoklaviertes Wasser unter leichtem Schütteln hinzugegeben. Nach dem Abkühlen der Lösung wurden 250 ml kaltes, zweifach konzentriertes Medium CMRL 1066 zugefügt, sodaß sich eine 1,6%ige Lösung ergab. Diese wurde 24 Stunden lang bei 4°C stehengelassen, dann in sterile Flaschen abgefüllt und bis zu 1 Monat bei 4°C gelagert. Für die Kultur wurde die Methylzellulose in einer Endkonzentration von 0,8% verwendet.

Herstellung des L-conditioned Mediums:

Mäuse-L-Zellen wurden in Medium CMRL 1066 mit 2% Strep-

tomycin/Penicillin und 10% fetalem Kälberserum 7 Tage lang in Kulturflaschen mit je 11 ml Inhalt bei 37°C gezüchtet. Am 7. Tag wurde das überstehende Medium abpipettiert, durch ein 0,45 µ Millipore Filter steril filtriert und bei 4°C bis zu 3 Monaten gelagert.

Herstellung der Rinder-Albuminlösung:

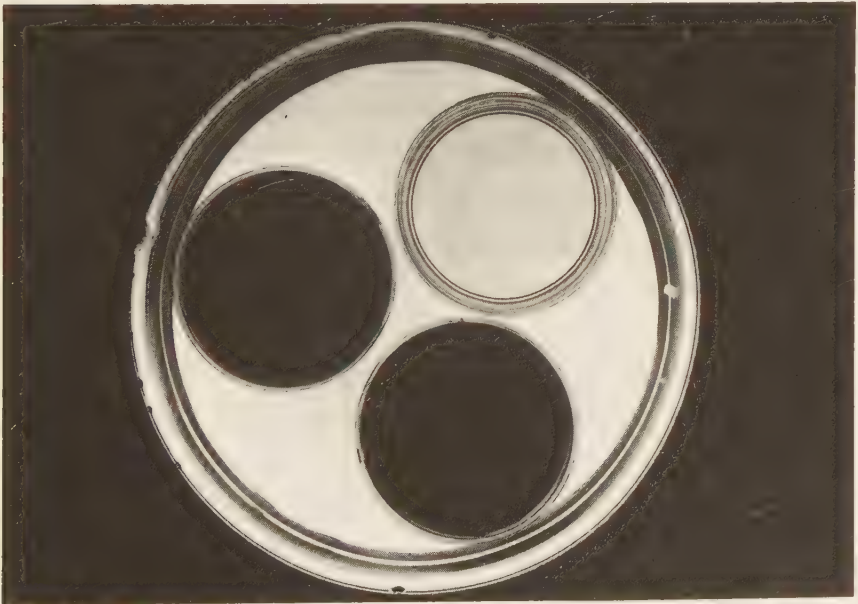
100 g BSA-Puder wurden in 182 ml autoklaviertem, glasdestillierten Wasser aufgelöst und die sich ergebenden 250 ml einer 40%igen Lösung 4 Tage lang bei 4°C gerührt. Um die Lösung zu deionisieren, wurden 10 g eines Austauscherharzes (AG-501-X8, Bio-Rad Laboratories, München) hinzugefügt, 4 Stunden zusammen bei 4°C gerührt und schließlich zur Abtrennung des Austauscherharzes unter Druck durch Filter verschiedener Porengröße, die in Sandwich-Technik übereinandergelegt wurden (Glasfaserfilter, Millipore Membranfilter 1,2 µ und 0,8 µ), filtriert. Darauf wurden noch einmal 10 g Austauscherharz zugegeben, 12 Stunden lang bei 4°C gerührt und wie nach dem erstenmal filtriert. Im Anschluß daran wurde die Lösung unter Druck durch ein 0,45 µ Millipore Membranfilter steril filtriert, in Flaschen zu Mengen von 20 bis 30 ml abgefüllt und bei -20°C bis zu 1 Jahr aufbewahrt. Der pH-Wert der mit PBS isotonisch gemachten etwa 37%igen BSA-Lösung betrug 5,4.

Streptomycin/Penicillin und L-Asparagin wurden nach dem Abwiegen 30 Min lang unter UV-Licht gelegt.

Der Phosphatpuffer enthielt auf 100 ml Wasser
8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g NaH_2PO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 .

4. Kulturtechnik

In der nach Präparation der Mäuse gewonnenen Knochenmarkszellsuspension wurden die kernhaltigen Zellen gezählt. Um im Kulturmedium eine Endkonzentration von 10^6 Zellen/ml zu erreichen, wurde die nötige Menge an Zellsuspension mit Medium CMRL 1066 auf die im Kulturmedium verwendete Menge (28%) CMRL 1066 ergänzt und dem übrigen Kulturmedium zugegeben.

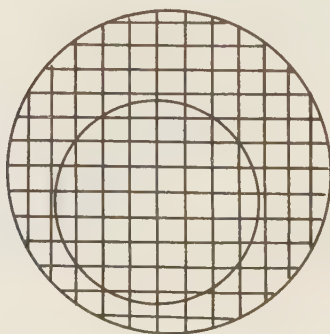


Anordnung der Kulturschalen

Nach gründlichem Mischen wurde je 1 ml davon in sterile Petrischalen aus Plastik (Durchmesser 3,5 cm; Greiner, Nürtingen) pipettiert, von denen vorher je drei in eine große sterile Glas- oder Plastik-Petrischale (Durchmesser 10 cm) gestellt worden waren. Je 2 solche kleine Schalen wurden mit dem Gemisch aus Kulturmedium und Knochenmarkszellen gefüllt, die dritte in derselben großen Petrischale mit 5 ml autoklaviertem, glasdestillierten Wasser. Darauf wurden die Kulturschalen bei 37°C und 6,5% CO₂ in Luft, in feuchter Atmosphäre (Luftfeuchtigkeit über 80%) 7 Tage lang inkubiert.

5. Auswertung

Nach 7 Tagen wurden die Zellhaufen mit mehr als 30 Zellen als Kolonien unter einem umgekehrten Mikroskop mit 100-facher Vergrößerung gezählt. Um das Zählen zu erleichtern, wurde eine Plastikpetrischale als Unterlage benutzt, deren Boden in Quadrate eingeteilt war.



Petrischale mit darunterliegendem Gitter

6. Schwierigkeiten

- a) Beim Deionisieren der hochprozentigen, zähen BSA-Lösung konnte die Trennung vom Austauschharz nicht wie beschrieben durch Zentrifugation erreicht werden. Deshalb wurde die Sandwich-Technik mit verschiedenen dichten übereinanderliegenden Millipore-Membranfiltern (oben Glasfilter, nach unten zu kleinere Porengrößen) verwendet.
- b) Nach der 3. Versuchsreihe fanden sich auf den Kulturen makroskopisch sichtbare Pilzkolonien. Vermutlich waren die verwendeten C₃H-Mäuse mit Pilzen infiziert. Während der Präparation der Femora müssen Pilze in die Knochenmarkszellsuspension geraten sein, sodaß die Kulturen unsteril wurden. Die Pilze wurden in der dermatologischen Klinik als Schimmelpilze identifiziert. Nach der Verwendung von Actidione (43 mg in 100 ml CMRL 1066, Upjohn Comp., Michigan) wurden keine Pilze mehr beobachtet. Das Wachstum der Knochenmarkszellkolonien wurde dadurch nicht beeinträchtigt.
- c) Im Gegensatz zu den jederzeit vom selben Stamm verfügbaren Mäuse-Knochenmarkszellen konnten menschliche Knochenmarkszellen meist nur von verschiedenen Patienten oder Leichen gewonnen werden. Aus technischen Gründen gelang es nur einmal, Knochenmark von einem gerade Verstorbenen (als Nullwert) und danach vom selben Menschen zu verschiedenen Zeiten nach dem Tod zu gewinnen.

Im Sektionssaal wurde Knochenmark aus dem Beckenkamm zu verschiedenen Zeiten nach Eintritt des Todes entnommen. Hier scheiterte der Versuch manchmal an der ungenügend sterilen Entnahme des Materials. Um die Infektionsgefahr unmittelbar bei der Gewinnung zu verringern, wurde die Haut über dem Beckenkamm zunächst mit Jodtinktur gereinigt, mit einem sterilen Einmalmesser bis auf den Knochen durchtrennt und zur Seite gehalten. Die Entnahme wurde mittels steriler Hohlneedeln, die (mit Mandrin) in den Markraum gedrückt wurden, durchgeführt. Eine Pilzinfektion wurde bei menschlichen Knochenmarkskulturen in keinem Versuch beobachtet.

7. Versuchsplan

Die Versuchstiere wurden 0,2,4,8,16,24,36,48 und 72 Stunden vor der Präparation getötet und bis zur Präparation in Plastiktüten bei 4°C aufbewahrt. Die sofort nach dem Tod (0 Std-Wert) entnommenen Zellen ergaben im Kulturversuch die Anzahl von Kolonien, die als Nullwert diente und 100% gesetzt wurde. Die Zahl der Kolonien, die aus den zu späteren Zeitpunkten nach dem Tod entnommenen Knochenmarkszellen entstanden waren, wurde in % dieses Nullwertes angegeben.

8. Trypanblaumethode

Diese Methode wurde zu Vergleichszwecken in einer Versuchsreihe mit Mäuse-Knochenmarkszellen parallel zur Kulturmethode, mit demselben Zellmaterial und unter

denselben äußeren Bedingungen angewendet. Zu einem Tropfen der nach Präparation gewonnenen Knochenmarkszellsuspension wurde ein Tropfen Trypanblau gegeben. In einer Zählkammer wurden dann unter dem Mikroskop die angefärbten Zellen gezählt und das Ergebnis in % der insgesamt gezählten Zellen angegeben.

Ergebnisse

1. mit Mäuse-Knochenmark

Mit Knochenmarkszellen von C_3H -Mäusen wurden 6 Versuchsreihen angelegt. Dabei wurden die Zellen jeweils 0,2,4, 8,16,24,36,48 und 72 Stunden nach dem Töten der Mäuse entnommen und unmittelbar nach Präparation in das Kulturmedium gebracht. Nach einigen Vorversuchen mit verschiedenen Zellkonzentrationen erwies sich bei C_3H -Mäusen der Wert von 10^6 Zellen/ml Kulturmedium als geeignet für die Kultur, da in diesem Fall die Anzahl der Kolonien beim Nullwert zwischen 150 und 200 lag (Durchschnittswert 178).

Jeder Punkt der folgenden Kurven entspricht dem Mittelwert von 10-12 mit der gleichen Zellsuspension angelegten Kulturen, die jeweils unter gleichen Bedingungen (Zusammensetzung des Mediums, CO_2 -Gehalt in Luft, Temperatur, Luftfeuchtigkeit im Inkubator, usw.) gewachsen waren. Die in 1 ml Medium eingesetzten 10^6 kernhaltigen Knochenmarkszellen ergaben nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen im Durchschnitt 178 Kolonien. Das be-

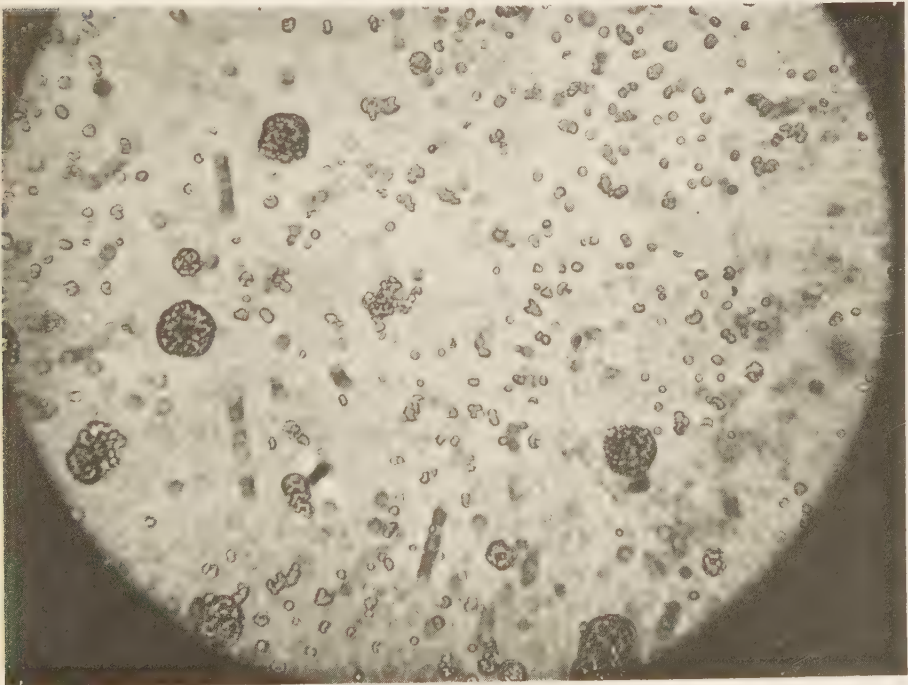
deutet, wenn man annimmt, daß jede Kolonie aus einer eingesetzten Knochenmarks-Stammzelle hervorgeht, ein Verhältnis von etwa 1 Stammzelle in 6000 eingesetzten Knochenmarkszellen. Übereinstimmend in allen 6 Versuchsreihen zeigte sich für das Knochenmark, das 36 Stunden nach dem Tod der Mäuse entnommen und in Kulturmedium gebracht worden war, eine Überlebensfähigkeit von mehr als 70%. Die Abweichungen vom Mittelwert hatten bei diesem Wert ein Minimum. Entnimmt man das Knochenmark in kürzeren Abständen nach dem Tod der Mäuse, so sinkt die Kurve zunächst auf 36% Lebensfähigkeit des Nullwertes. Dieses Minimum liegt bei 4 Stunden nach dem Tod. Dann steigt die Kurve an, erreicht bei 36 Stunden ein Maximum von 70% Lebensfähigkeit des Nullwertes und sinkt danach auf einen Wert von 54% bei 72 Stunden ab.

Die parallel zu einer Versuchsreihe durchgeführte Trypanblaumethode zeigte ähnliche Ergebnisse. Die Verlaufskurve weist jedoch im Vergleich zur Kulturmethode weder ein Minimum beim 4 Std-Wert noch ein deutliches Maximum beim 36 Std-Wert auf.

2. mit menschlichem Knochenmark

Es wurden Kulturen von Knochenmarkszellen lebender Patienten, eben Verstorbener und von Leichen aus dem Sektionssaal zu verschiedenen Zeiten nach dem Tod angelegt. Dabei wurde nur Material von solchen Menschen genommen, bei denen keine Erkrankung des hämopoetischen Systems

bekannt oder Todesursache war. Eine Konzentration von $5 \cdot 10^4$ kernhaltigen Zellen pro ml Medium erwies sich als geeignet für die Kultur, da hierbei die Anzahl der Kolonien beim Nullwert durchschnittlich 1100 betrug. Bei Verringerung der Konzentration der eingesetzten Knochenmarkszellen auf 10^4 pro ml ergaben sich zu niedrige Kolonienzahlen (durchschnittlich 30).



Kolonien von menschlichen Knochenmarkszellen

Es wurde Knochenmark von 40 Minuten bis zu 37 Stunden nach dem Tod entnommen und unmittelbar nach der Entnahme in Kulturmedium gebracht. Bis zu 19 Stunden nach dem Tod betrug die Zahl der Kolonien durchschnittlich 1000, wobei allerdings Schwankungen auftraten. 21, 24, 25 und 37 Stunden nach dem Tod entnommene Knochenmarkszellen zeigten keine Kolonienbildung in der Kultur.

Schon ein Zeitraum von 8 Stunden zwischen dem Tod eines Patienten und der Entnahme des Knochenmarks zu Transplantationszwecken wäre von praktischer Bedeutung.

Zu Abbildung 1 (Seite 15):

6 Versuchsreihen mit Mäuse-Knochenmarkszellen

Abszisse: hpm = Stunden nach dem Tod der Tiere, deren Knochenmark für die Versuche verwendet wurde.

Ordinate: Lebensfähigkeit der Knochenmarkszellen in %
(100% = Lebensfähigkeit der Zellen, die sofort nach dem Tod der Tiere in Kultur gebracht wurden.)

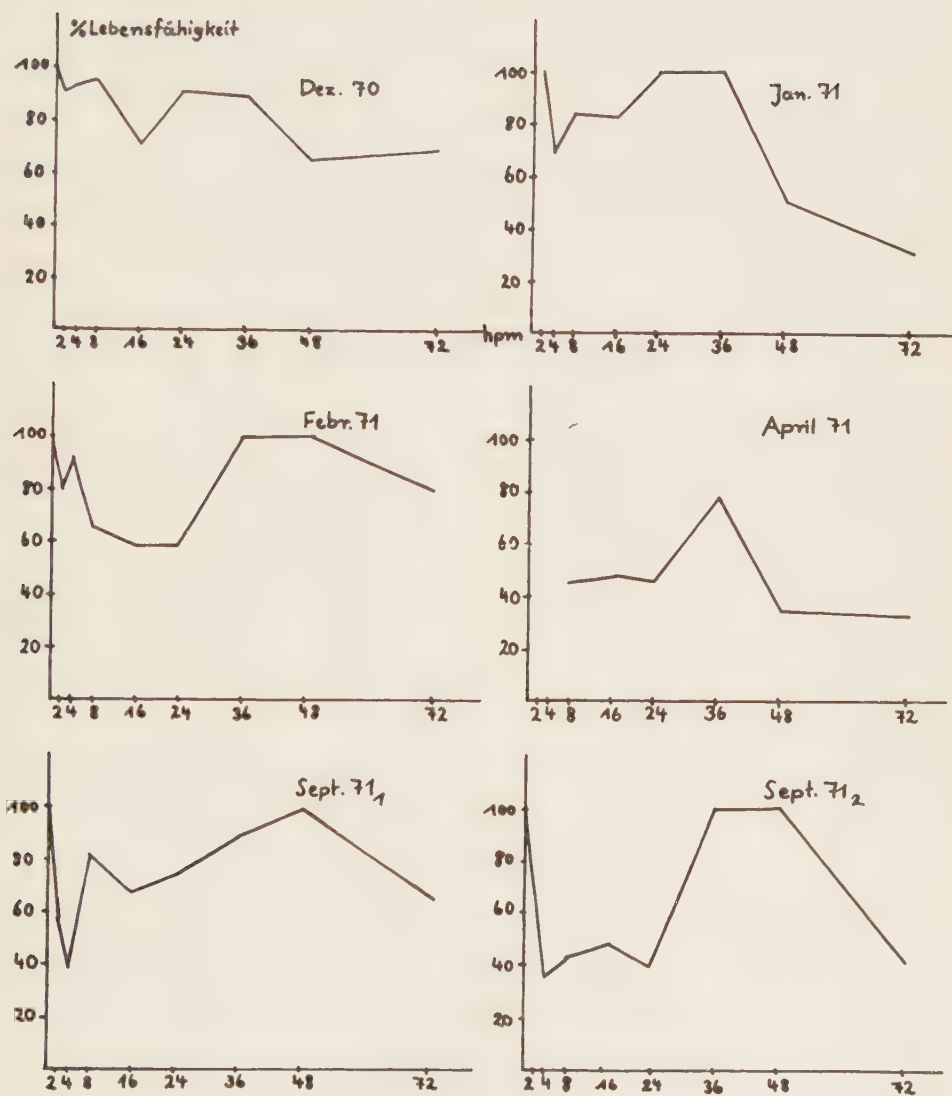


Abb. 1

Zu Abbildung 2 (Seite 16):

Einzelwerte der Versuche aus Abb. 1 mit Angabe der jeweils eingesetzten Zahl von Knochenmarkszellen (Zellzahl/ml), der in Kultur gezählten Kolonien (CFU), der Standardabweichung (σ) und der zugehörigen Prozentwerte bezüglich der Nullwerte.

Versuch Nr. 20-23 entspricht Kurve Dez. 70 in Abb. 1

24-28	Jan. 71
29-31	Febr. 71
34	April 71
45-48	Sept. 71 ₁
47-49	Sept. 71 ₂

10% LEBENSFÄHIGKEIT

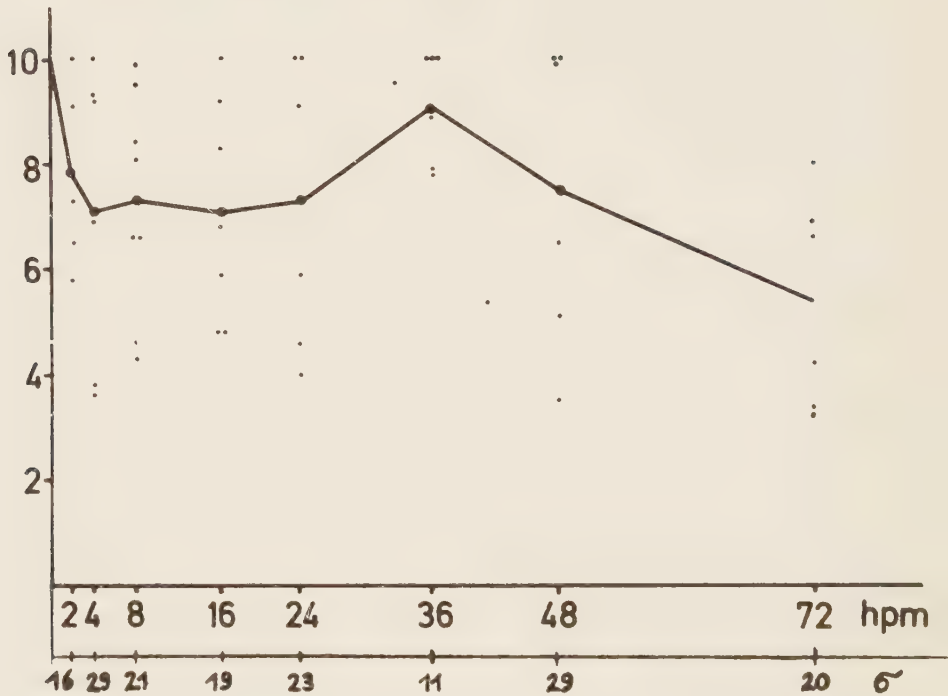


Abb. 3: Kurve aus den Mittelwerten der Ergebnisse der 6 Versuchsreihen.

Zu Abb. 4: Vergleich der Ergebnisse mit der Kulturmethode und der einer Versuchsreihe mit der Trypanblaumethode.

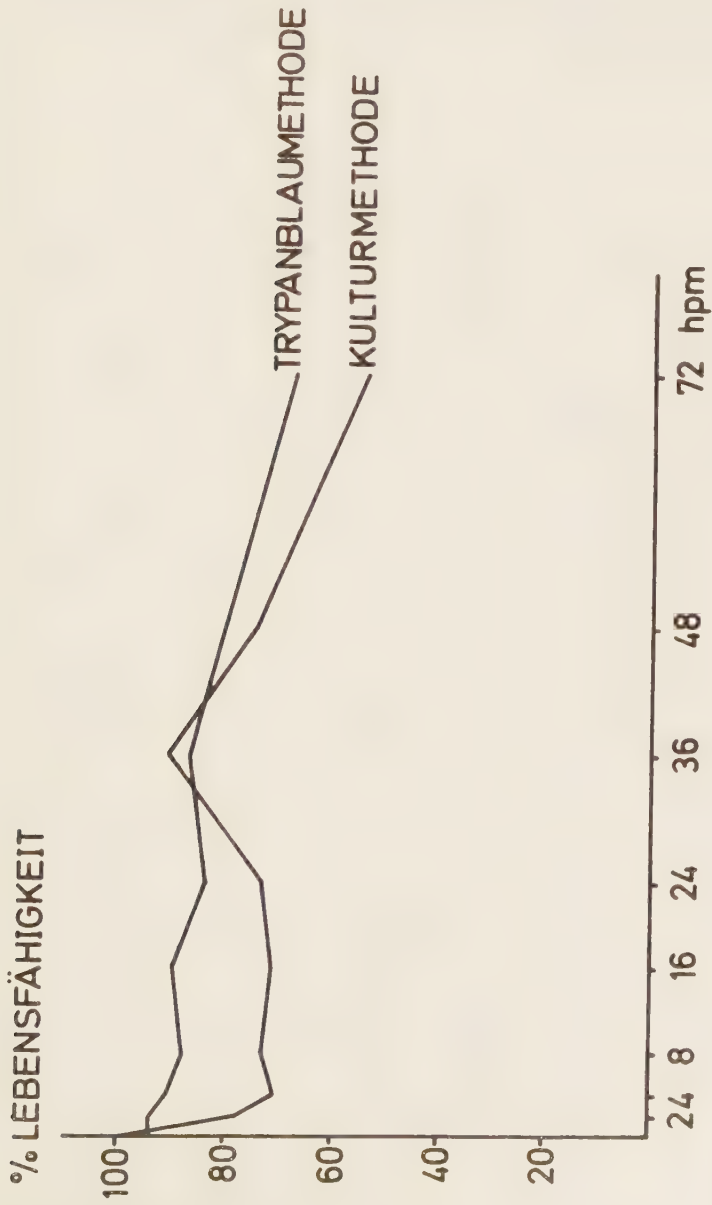


Abb. 4

Abb. 5: Versuche mit menschlichen Knochenmarkszellen.

Spendor	eingesetzte Zellz./ml	gezählte Kolonien/ml	KM-Entnahme hpm
Pat. A	$2 \cdot 10^5$	770	0
Pat. B	10^5	2 000	0
"	$5 \cdot 10^4$	1 200	0
"	$5 \cdot 10^5$	} zu viele Kolon., um sie zu zählen	0
"	$2,5 \cdot 10^5$		0
Pat. C	$5 \cdot 10^4$	624	0
Pat. D	$5 \cdot 10^4$	1500	0
Pat. E	$5 \cdot 10^4$	1200	0
Pat. F	10^5	1200	0,6
"	10^4	31	0,6
"	10^5	1 200	6
"	10^4	28	6
65 ♂	$5 \cdot 10^4$	650	6,5
82 ♀	$5 \cdot 10^4$	1200	7
15 ♀	$5 \cdot 10^4$	1180	8
79 ♀	$5 \cdot 10^4$	328	11
69 ♀	$5 \cdot 10^4$	2000	12
Pat. F	10^5	1200	19
6 ♀	$5 \cdot 10^4$	-	21
60 ♂	$5 \cdot 10^4$	1000	22
81 ♀	$5 \cdot 10^4$	-	24
35 ♂	$5 \cdot 10^4$	-	25
70 ♂	$5 \cdot 10^4$	-	37

Diskussion

Bisher wurden verschiedene Methoden verwendet, um die Überlebensfähigkeit von Knochenmarkszellen nachzuweisen.

1. Restitution letalbestrahlter Tiere

Urso und Congdon (29) befaßten sich schon 1957 mit dem Problem der kurzfristigen Aufbewahrung von Mäuse-Knochenmarkszellen. Sie lagerten normales Mäuse-Knochenmark, um die maximale Zeit zu bestimmen, nach der Spenderknochenmarkszellen noch fähig sind, letal bestrahlte Mäuse vor dem Tod zu bewahren. Das Mäuse-Knochenmark wurde in Zellsuspension, in intakten exzidierten Femora und in intakten Femora im Mäusekadaver gelagert. Die Temperaturbedingungen bei der Lagerung waren Kühlung ($2-5^{\circ}\text{C}$) und Raumtemperatur ($22-25^{\circ}\text{C}$). Als Lagerungsmedium wurde Tyrode's Lösung verwendet. Die Bewertung des gelagerten Knochenmarks basierte auf seiner Fähigkeit, syngene letalbestrahlte Mäuse zu schützen. Kriterium für die Bewertung des Schutzes war die prozentuale 30-Tage-Überlebenszeit der Empfänger. maximale Lagerungszeit für intakte exzidierte Femora war 4 Tage, für Zellsuspensionen 5 Tage. Spenderknochenmark, das bei Raumtemperatur gelagert wurde, war in Zellsuspension bis zu 2 Tagen und in intakten Femora bis zu 1 Tag wirksam. Knochenmark von Kadaverfemora zeigte nach 1 Tag keine Aktivität. Diese Methode gibt qualitativ eine sehr gute

Aussage über die Überlebensfähigkeit der verwendeten Knochenmarkszellen. Nachteile sind jedoch, daß sie nur beim Tier anwendbar ist und daß eine quantitative Aussage erst möglich wird, wenn man vorher die minimale Dosis Knochenmarkszellen heraustestet, die für ein Überleben notwendig ist.

2. Trypanblau und Thymidin

Kurnick und Nokay (11) benutzten in ihrer Arbeit über das Überleben von gefrorenen gelagerten menschlichen und Mäuse-Knochenmarkszellen als Beweis für die Lebensfähigkeit der Zellen die Erhaltung der morphologischen Integrität der Zellen, ihre Fähigkeit, den Farbstoff Trypanblau auszuschließen und die Inkorporation von radioaktiv markiertem Thymidin. Sie fanden nach einer Lagerungszeit von 7 Jahren eine Reduktion des Zellanteils, der zum Ausschluß von Trypanblau fähig ist; die Fähigkeit, Thymidin einzubauen schien erhalten geblieben zu sein.

Die Trypanblau-Methode ist einfach aber ungenau. Sowohl die Trypanblau- als auch die Thymidin-Methode geben nur den Gesamtanteil aller Knochenmarkszellen an, zeigen aber nicht die Zellen, auf die es ankommt. Bei einem Verhältnis von 1:6000 kann man die Stammzelle unter den übrigen Knochenmarkszellen nicht identifizieren. Andererseits könnten diese Zellen gerade z.B. zu 95% unter 5% überlebenden Zellen sein oder umgekehrt.

3. Morphologie

Es wurde auch versucht, die Überlebensfähigkeit von Zellen nach dem Tod des Spenders nur anhand von morphologischen Veränderungen zu beurteilen (Rickert und Vidone 23). Man prüfte Knochenmark von Leichen aus dem Sektionssaal, indem man Abstriche unter Verwendung von Rinderalbumin anfertigte. 24 Stunden nach dem Tod des Patienten, dem das Knochenmark entnommen wurde, zeigten sich Veränderungen, welche die Autoren als "Kühleffekt" bezeichnen: Schrumpfen und Klumpen der Zellen, Verlust der zellulären Organellen. Nach 1-2stündigem Aufbewahren bei Zimmertemperatur erhielten sie merkwürdigerweise bessere Ausstriche als bei sofortiger Verarbeitung des Knochenmarks. Als Ergebnis der Untersuchungen zeigte sich, daß die reifsten Elemente, besonders die segmentierten Neutrophilen durch postmortale Veränderungen zuerst geschädigt werden. Stromaelemente, Lymphozyten (möglicherweise sind unter ihnen die Stammzellen zu finden), Plasmazellen und viele Eosinophile hielten sich länger. Die erythroblastischen Elemente zeigten sich auch widerstandsfähiger gegen Veränderungen. Megakaryozyten blieben unterschiedlich gut erhalten, ohne daß eine Beziehung zwischen dem Zeitraum nach dem Tod des Spenders und ihrer morphologischen Unversehrtheit entdeckt werden konnte. Rickert und Vidone glauben, daß die Veränderungen des Knochenmarks nach dem Tod durch

schnelle Autolyse entstehen, die wahrscheinlich durch Azidose in der agonalen oder frühen postmortalen Periode verursacht wird.

Hoffman et al. (8) konnten keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß der zellulären Autolyse nach Alter, Geschlecht oder Todesart aufzeigen. Die Umgebungstemperatur beeinflusste das Ausmaß der Veränderungen nicht entscheidend. Sie berichteten, daß 3 Stunden nach dem Tod die Zahl der Granulozyten nur noch ein Drittel des ursprünglichen Wertes betrug. 5 Stunden nach dem Tod blieben noch die Hälfte bis ein Drittel der polymorphkernigen Leukozyten übrig, 7 Stunden danach konnte nicht einmal ein Viertel des Ausgangswertes identifiziert werden. Während die reiferen Zellen abnahmen, zeigten die weniger reifen Zellen vom Metamyelozyten bis zum Myeloblasten 8 bis 12 Stunden nach dem Tod eine leichte Zunahme, danach begann die Zahl der Metamyelozyten ebenfalls abzunehmen. Karyorhexis und Karyolysis der Normoblasten begannen 3 bis 4 Stunden nach dem Tod und zeigten 10 Stunden nach dem Tod ein Ausmaß, wie es beim lebenden Menschen nie beobachtet worden war. Die Lymphozyten zeigten keine morphologischen Veränderungen bis zu 15 Stunden nach dem Tod, ebenso war es bei den Plasmazellen. Monozyten verschwanden nach etwa 3 Stunden aus dem Knochenmark. Megakaryozyten verhielten sich sehr unterschiedlich, konnten aber im allgemeinen 9

Stunden nach dem Tod nicht mehr identifiziert werden. Die Struktur der Stromazellen blieb bis zu 14 Stunden nach dem Tod gut erkennbar.

Als alleiniger Nachweis für die Überlebensfähigkeit von Knochenmarkszellen ist die morphologische Methode nicht anwendbar, da nicht sicher ist, ob eine mikroskopisch nachgewiesene Unversehrtheit der Zellstruktur gleichgesetzt werden kann mit erhaltener Funktionsfähigkeit der Zelle. Man kann höchstens strukturell zerstörte Zellen als tot bezeichnen, keineswegs aber von der Zahl der unversehrten Zellen auf die der lebenden Zellen oder gar der Stammzellen schließen.

4. Beweglichkeit

Perry et al. (20) benutzten die Beweglichkeit der Knochenmarkszellen als Indikator für ihre Lebensfähigkeit. Material von 70 menschlichen Leichen, entnommen 1,5 bis 102 Stunden nach dem Tod, wurde in flüssiges Kulturmedium gebracht und unter dem Mikroskop beobachtet, um die Zeit, in der die Beweglichkeit der Zellen erhalten blieb, in Beziehung zu der Zeit nach dem Tod setzen zu können. Es fanden sich bis zu 50 Stunden nach dem Tod bewegliche Zellen im Knochenmark. Dabei wurde jedoch nicht versucht, die Zellen, deren Beweglichkeit beobachtet wurde, zu identifizieren. Die Autoren schränken die Aussagekraft ihrer Versuche selbst ein: Offensichtlich kann die Beweglichkeit nicht unbedingt als Indikator für mög-

liches Zellwachstum benutzt werden (bewegliche erwachsene Leukozyten können sich wahrscheinlich nicht vermehren) und sie bedeutet auch nicht unbedingt, daß Faktoren in dem Material erhalten sind, welche fähig sind, einen letalbestrahlten Menschen zu retten.

Technisch ist die Beobachtung unter dem Mikroskop einfach, aber es dürfte große Schwierigkeiten bereiten, in einer so untersuchten Knochenmarkszellsuspension den Störfaktor der Fibroblasten auszuschließen oder gar die beobachteten beweglichen Zellen als Stammzellen zu identifizieren.

Alle diese Methoden haben den Nachteil, daß sie nicht die Stammzellen erfassen, da man diese nicht kennt.

Sie geben auch mit Ausnahme der ersten kein Äquivalent für die Stammzellen. Ein Fortschritt war es nun, als es gelang, eine Methode zu finden, die einen direkten Schluß auf die Funktion der Stammzellen zuläßt:

Till und Mc Culloch entwickelten 1960 eine in vivo-Methode, die Milz-Kolonien-Technik (31), mit deren Hilfe man quantitativ die Überlebensfähigkeit von Knochenmarkszellen nach Injektion in letalbestrahlte Tiere durch die Bildung von Milzkolonien nachweisen kann. Da diese Methode nur bei Tieren anwendbar ist, suchte man nach in vitro-Methoden, mit denen auch menschliche Knochenmarkszellen getestet werden könnten.

Pluznik et al. (22), Bradley et al. (2) und Ichikawa et

al. (9) entwickelten eine in vitro-Kulturmethode, bei der Zellen, die von hämopoetischen Mäuseorganen stammen, in einem semisoliden Medium Kolonien bilden, dem ein sogenannter conditionierender Faktor zugesetzt wurde. Obwohl seine chemische Struktur noch nicht bekannt ist, kennt man viele Quellen, die diesen Faktor enthalten (1); zum Beispiel verwendete man Nährschichten aus Mäusenieren (27), Leukämieseren (14), leukämische (15) und normale (6,7,24) Mäuseseren, verschiedene menschliche Seren (17), Medium, das von L-Zellen zubereitet worden war (31,28) und menschlichen Urin (25,18,30). Schließlich wurden auch Nährschichten aus normalen menschlichen peripheren weißen Blutzellen (10,21) und dem überstehenden Medium von inkubierten menschlichen Blutkörperchen (3) und solche aus embryonalen Mäusefibroblasten (5) als Stimulantien für die Kolonienbildung verwendet. Ein weiterer Unterschied der verschiedenen in vitro-Kulturen besteht in der Verwendung von Agar oder Methylzellulose zur Immobilisierung der Knochenmarkszellen. Einen gewissen Vorteil bietet die Kulturtechnik mit Agar deshalb, weil man die nach 7 Tagen Inkubationszeit gebildeten Kolonien durch Agarase und wiederholtes Waschen der Zellen isolieren und für weitere Versuche (zum Beispiel für anschließende Tierversuche) verwenden kann (5). Die erhaltenen Kolonien ließen sich bei den verschiedenen Methoden übereinstimmend in drei Gruppen

einteilen: Kolonien mit Granulozyten, mononukleären Zellen und gemischte Kolonien (2,14,17,3,21,6,16,32). Neben Granulozyten und Mononukleären wurden keine anderen differenzierten Zellarten beobachtet (14). Die Tatsache, daß die Kolonien Zellen enthalten, die morphologisch als Granulozyten identifiziert wurden, läßt eine Beziehung zwischen den Ursprungszellen der Kolonien und der Granulopoese vermuten. Wu et al. (32) brachte den Beweis für eine Beziehung zwischen Koloniebildung in Kultur und Hämpoese in vivo, indem er radioaktiv markierte Chromosomen in Zellen von Kolonien in vivo und von Kolonien in Kultur nachwies. So zeigte er, daß die Ursprungszellen beider Kolonietypen zu demselben Klon gehören können. Eine Aussage über die Stellung der beiden Ursprungszellen innerhalb dieses Klons ist dadurch nicht möglich: die Zellen, welche für die Kolonienbildung in vivo verantwortlich sind, könnten mit den Zellen, die in Kultur Kolonien bilden identisch sein, oder der eine Zelltyp könnte eine Vorstufe des anderen darstellen. Sutherland et al. (28) kam zu dem Ergebnis, daß durch die Milz-Kolonien-Technik die pluripotente Stammzelle getestet werden kann, während in Zellkultur eine Zelle nachgewiesen wird, welche die Vorstufe für die Granulopoese darstellt. Dicke et al. (5) verglich die Zahl der Kolonien, die aus Suspensionen von Mäuse-Knochenmarkszellen in Kultur (Agar-Methode) gebildet wurden, mit dem

Gehalt dieser Kolonien an Zellen, die fähig waren, in vivo (Milz-Kolonien-Technik) Kolonien zu bilden. Es wurden eindeutige Parallelen zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden gefunden. Zudem konnte aus den Zellen der 5 Tage alten Agar-Kolonien unter gewissen Bedingungen eine größere Zahl von Kolonien in der Milz erzielt werden als ursprünglich Zellen in die Kulturschalen gebracht worden waren. Dies zeigt, daß die in Kultur Kolonien bildenden Zellen sowohl die Forderung der Pluripotenz als auch der Selbsterneuerung erfüllen, beides Bedingungen für jede Zelle, die Anspruch darauf erhebt, eine hämopoetische Stammzelle zu sein.

Die von uns verwendete Kulturmethode von Pluznik et al., Bradley et al. und Ichikawa et al. hat den Vorteil, daß sie im Vergleich zu den Methoden mit verschiedenen Nährschichten einfacher (Mono-layer) und zudem relativ gut reproduzierbar ist.

Um die Zellen der in Kultur gewachsenen Kolonien identifizieren und vielleicht weiterverwenden zu können, mußte man ähnlich der Agarase bei der Verwendung von Agar als Medium hier eine Methylzellulase benutzen, um das zähe Medium zu verflüssigen.

Unseres Wissens wurde diese Kulturtechnik noch nicht benutzt, um die Überlebensfähigkeit von Knochenmarkszellen nachzuweisen.

Die ersten vorgelegten Untersuchungen zeigen,

1. daß die Methode möglicherweise einen guten Funktionstest zur Beurteilung der Überlebensfähigkeit von Knochenmarks-Stammzellen darstellt und
2. daß das Knochenmark nach dem Tod eine gewisse Zeit überlebt und die Stammzellen zu den relativ lang überlebenden Zellen gehören.

Eine direkte Erklärung für den Abfall der Überlebensfähigkeit der Knochenmarkszellen bis zu 4 Std nach dem Tod und den Wiederanstieg bis 36 Std haben wir nicht gefunden. Eine mögliche Erklärung für den Abfall der Koloniezahlen bei den Versuchen mit Mäuse-Knochenmarkszellen bis zu 4 Std nach dem Tod wäre die Wirkung von autolytischen Prozessen in den Markräumen post mortem. Den Wiederanstieg bis zum Maximum bei 36 Std nach dem Tode könnte man auf die größere Widerstandsfähigkeit der weniger differenzierten Stammzellen gegenüber den reifen Zellen, die sich in diesem Zeitraum bemerkbar macht, und die dadurch zustandekommende relative Anreicherung der Stammzellen zurückführen. Die 4 Std nach dem Tod im Knochenmark noch enthaltenen zahlreichen reifen Zellen behindern möglicherweise das Wachstum der Kolonien in vitro.

Bei menschlichem Knochenmark wurden vor allem Zellen in Kultur gebracht, die länger als 4 Std nach dem Tod entnommen worden waren. Außerdem war die Zahl der Versuche gegenüber denen mit Mäuse-Knochenmark zu gering, um ei-

nen Vergleich anstellen zu können.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Überlebensfähigkeit von Mäuse- und menschlichen Knochenmarkszellen anhand der in vitro-Kultur-Methode nach Fluznik et al., Bradley et al. und Ichikawa gemessen.

Für Mäuse-Knochenmarkszellen zeigte sich 36 Std nach dem Tod des Tieres eine Überlebensfähigkeit von mehr als 70%.

Bei den Versuchen mit menschlichem Knochenmark ergab sich ein steiler Abfall der Lebensfähigkeit 20 Std nach dem Tod. Dazwischen konnte noch kein den Ergebnissen der Tierversuche entsprechender Gipfel gefunden werden. Vielmehr schien die Zahl der Kolonien zwischen 0 und 20 Stunden nach dem Tod etwa konstant gleich hoch zu bleiben.

Literaturverzeichnis

1. Bradley T.R., Summer M.A.

Stimulation of mouse bone marrow colony growth in vitro by conditioned medium

Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46:607, 1968

2. Bradley T.R., Metcalf D.

The growth of mouse bone marrow cells in vitro

Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44:287, 1966

3. Chervenick P.A., Boggs P.R.

Bone marrow colonies: stimulation in vitro by supernatant from incubated human blood cells

Science 169:691, 1970

4. Congdon C.U.C.

Cooperative Group on Bone Marrow Transplantation in Man
Report of worksessions held June 16-17, 1969, at Hopital
Paul-Brousse, Villejuif, France

Exptl. Hem. 20:97-117, 1970

5. Dicke K.A., Platenburg M.G.C., van Bekkum D.W.

Colony formation in agar: in vitro assay for hemopoietic stem cells

Cell Tissue Kinet. 4:463-477, 1971

6. Foster R., Metcalf D., Kirchmeyer R.

Induction of bone marrow colony-stimulating activity by a filtrable agent in leukemic and normal mouse serum

J. Exp. Med. 127:853, 1968

7. Hall B.M.

The effects of whole body irradiation on serum colony stimulating factor and in vitro colony-forming cells in the bone marrow

Brit. J. Hemat. 17:553, 1969

8. Hoffman S.B., Marrow G.W.Jr., Pease G.L., Stroebe C.F.
Rate of cellular autolysis in post-mortem bone marrow
Am. J. Clin. Path. 41:281, 1964
9. Ichikawa Y., Pluznik D.H., Sachs L.
In vitro control of the development of macrophage and
granulocyte colonies
Proc. Nat. Acad. Sci. 56:488, 1966
10. Iscove N.N., Senn J.S., Till J.E., McCulloch E.A.
Colony formation by normal and leukemic human marrow cells
in culture: effect of conditioned medium from human leukos
Blood Jan. 1971,1
11. Kurnick N., Nokay N., Hampton B.
Survival of frozen stored human and mouse bone marrow cell
Rad. Res. 32:706-722, 1967
12. Mathé G., Amiel J.L., Schwarzenberg L., Choay J., Troland P.
Schneider M., Hayat M., Schlumberger J.R., Jannil Cl.
Bone marrow transplantation in man after treatment with ALS
Brit. Med. J. 2:131-136, 1970
13. Metcalf D.
Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow
cells
J. Cell. Physiol. 76 (1):89-101, 1970
14. Metcalf D., Bradley T.R., Robinson W.
Analysis of colonies developing in vitro from mouse bone
marrow cells stimulated by kidney feeder layers or leukemic
serum
J. Cell. Physiol. 69:93,1967

15. Metcalf D., Foster R.

Bone marrow colony stimulating activity of serum from mice
with virus-induced leukemia

J. Nat. Cancer Inst. 39:1235-1245, 1967

16. Metcalf D., Foster R.

Behavior on transfer of serum stimulated bone marrow colonies

Proc. Soc. Exp. Biol. 126:758-762, 1967

17. Metcalf D., Foster R.Jr., Robinson W.A., Bradley T.R.

Bone marrow colony stimulating activity in human sera
Brit. J. Haemat. 15:147, 1968

18. Metcalf D., Stanley E.R.

Quantitative studies on the stimulation of mouse bone
marrow colony growth in vitro by normal human urine

Aust. J. Exp. Biol. Med. 47:453-466, 1969

19. Meuwissen H.J., Gatti R.A., Terasaki P.J., Hong R., Goos R.A.

Treatment of lymphopenic hypogammaglobulinemia and bone
marrow aplasia by transplantation of allogeneic marrow

New Eng. J. Med. 281:691, 1969

20. Perry V.P., Stevenson R.E., Mc Farland W., Zink G.A.

Motility studies of human post-mortem bone marrow

Blood, 16:1020, 1960

21. Pike B., Robinson W.A.

Human bone marrow culture in agar gel

J. Cell. Physiol. 76:77, 1970

22. Pluznik D.H., Sachs L.

The cloning of normal "mast" cells in tissue culture

J. Cell. Comp. Physiol. 66:319, 1965

23. Rickert R.R., Vidone R.A.

Use of bovine albumin in the examination of bone marrow
obtained at autopsy

Blood 31 (1):74-80, 1968

24. Robinson W.A., Metcalf D., Bradley T.R.

Stimulation by normal and leukemic mouse sera of colony
formation in vitro by mouse bone marrow cells

J. Cell. Physiol. 69:83-92, 1967

25. Robinson W.A., Stanley E.R., Metcalf D.

Stimulation of bone marrow colony growth in vitro by human
urine

Blood 33:396, 1969

26. Santos G.W., Graw R.C.Jr.

Letter to Editor: Transplantation Nov. 1970

Bone marrow transplantation in patients with leukemia

27. Senn J.S., Mc Culloch E.A., Till J.E.

Comparison of colony forming ability of normal and leukemic
human marrow in cell culture

Lancet 2:597, 1967

28. Sutherland D.J.A., Mc Culloch E.A.

A kinetic study of the genetic control of hemopoietic pro-
genitor cells assayed in culture and in vivo

J. Cell. Physiol. 75:3, 1970

29. Urso J.S., Congdon C.C.

Short term preservation of mouse marrow at refrigeration
and room temperature for radiation experiments

J. App. Physiol. 10 (2):314-316, 1957

30. Vassort F., Frindel E., Tubiana M.

Effects of hydroxyurea on the kinetics of colony forming units of bone marrow in the mouse

31. Worton R.G., Mc Culloch E.A., Till J.E.

Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture

J. Cell. Physiol. 74:171-182

32. Wu A.M., Siminovitch L., Till J.E., Mc Culloch E.A.

Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cell and cells forming colonies in culture

Proc. Nat. Acad. Sci. 59:1209, 1968

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. S. Thierfelder, Herrn Dr. W. Mempel, der mir diese Arbeit anvertraute, sowie den Medizinisch-technischen Assistentinnen Fräulein R. Peine und Fräulein B. Dechamps für ihre Hilfe herzlich danken.

Lebenslauf

- 13.5.1947 geboren als Tochter des Werkzeugmachers
Rudolf Bannert und der Hausfrau Theresia
Bannert, geb. Denz
- 1953-1957 Besuch der Volksschule in Bad Tölz
- 1957-1966 Besuch der Oberrealschule in Bad Tölz
- 1966 Reifeprüfung
- 1966-1969 Vorklinisches Medizinstudium an der
Universität München
- 1969 Physikum, Note gut
- 1969-1972 Klinisches Medizinstudium an der
Universität München
- 1972 Staatsexamen, Note sehr gut
- Februar 1970-
Dezember 1971 Doktorarbeit im Institut für Hämatologie
der Gesellschaft für Strahlen- und Umwelt-
forschung, München
- August 1972-
November 1972 Medizinalassistentenzeit im Krankenhaus
Kempfenhausen der Stadt München (Innere)
- Januar 1973-
Februar 1973 Medizinalassistentenzeit in der I. Med.
Klinik der Universität München (Innere)
- März 1973-
August 1973 Medizinalassistentenzeit im Städtischen
Krankenhaus Bad Tölz (Chirurgie)

